

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20120051302082

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

维甲酸对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞的
诱导分化作用及其机理研究

Effects and Mechanisms of Differentiation Induced by
Retinoic Acid on Human Neuroblastoma SK-N-SH Cells

张 秀 艳

指导教师姓名: 李 祺 福 教 授

专 业 名 称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2008 年 10 月 22 日

论文答辩时间: 2008 年 11 月 25 日

学位授予日期: 2008 年 月 日

答辩委员会主席: 方永强 教授

评 阅 人: _____

2008 年 11 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要	1
ABSTRACT.....	3
前 言	5
1. 肿瘤的危害及抗癌研究现状.....	5
2. 肿瘤细胞诱导分化研究的理论和实践意义及发展方向.....	6
2.1 肿瘤细胞诱导分化的概念及其理论实践意义.....	6
2.2 肿瘤细胞诱导分化研究的现状及发展方向.....	7
2.3 肿瘤细胞诱导分化研究中所存在的问题.....	10
3. 系统生物学和蛋白质组学在肿瘤细胞研究中的应用.....	11
4. 人神经母细胞瘤的生物学特性及其终末诱导分化研究.....	13
4.1 神经母细胞瘤的生物学特性及其应用.....	13
4.2 神经母细胞瘤细胞的诱导分化研究.....	15
5. 本文的研究工作及其科学意义.....	16
材料与amp;方法	18
1. 细胞培养和诱导分化处理.....	18
2. 细胞生长曲线测定.....	18
3. 细胞周期测定.....	18
4. 细胞形态光镜观察样品的制备与观察.....	19
5. 电子显微镜样品制备和观察.....	19
6. 癌基因、抑癌基因蛋白的免疫细胞化学检测.....	19
7. 神经细胞诱导分化指标免疫细胞化学观察.....	20
8. 人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞分化诱导前后全细胞蛋白的双向凝胶电泳分析.....	21
9. 差异蛋白点 MALDI-TOF 质谱鉴定.....	22
实验结果	24
1. RA 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖的抑制作用	24
2. RA 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞形态影响	25
3. RA 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞癌基因、抑癌基因表达的影响	27

4. RA 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞分化指标相关蛋白表达的影响	28
5. RA 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞全细胞蛋白表达的影响	29
讨 论	38
1. RA 对 SK-N-SH 细胞分化的诱导效果	38
1.1 RA 对 SK-N-SH 细胞增殖和细胞周期进程的影响	38
1.2 RA 对 SK-N-SH 细胞形态与超微结构的影响	40
1.3 RA 对 SK-N-SH 细胞癌基因和抑癌基因表达的影响	42
1.4 RA 对 SK-N-SH 细胞分化标志物表达的影响	44
2. RA 诱导人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞分化过程中蛋白表达变化	46
3. 差异表达蛋白在人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞诱导分化过程中的作用	47
4. RA 诱导人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞分化的作用机制	58
结 论	62
参考文献	63
图版说明	75
致 谢	86

Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English.....	3
Introduction.....	5
1. The harm of tumor and the evolution of anticancer research	5
2. Tumor differentiation research and development trend	6
2.1 Tumor differentiation induction and the significance of this study	6
2.2 The existing condition and development trend of tumor differentiation study	7
2.3 The problem of tumor differentiation study	10
3. The use of Systems Biology and Proteomics in cancer research.....	11
4. Differentiation research of Human neuroblastoma SK-N-SH cells.....	13
4.1 The biology characteristic and the use of Human neuroblastoma SK-N-SH cells	13
4.2 Differentiation research of human neuroblastoma cells	15
5. Objects and significance of this study	16
Materials and methods.....	18
1. Culture and treatment of tumor cells	18
2. Analysis of growth curve	18
3. Analysis of cell cycle	18
4. Preparation of light microscope sample.....	19
5. Preparation of electron microscope sample	19
6. The immunocytochemistry assey of oncogenes and tumor suppressor genes expression	19
7. The immunocytochemistry assey of the expression of neuroal markers	20
8. 2D gel electrophoresis of SK-N-SH cells proteins	21
9. Different proteins identification by MALDI-TOF analysis	22
Results.....	24
1. Inhibition effects of RA on the proliferation of human neuroblastoma SK-N-SH	

cells	24
2. Influence of RA on the morphology of neuroblastoma SK-N-SH cells	25
3. Influence of RA on the expression of oncogenes and tumor suppressor genes of neuroblastoma SK-N-SH cells	27
4. Influence of RA on the expression of neuroal markers of neuroblastoma SK-N-SH cells	28
5. Influence of RA on the proteomics of neuroblastoma SK-N-SH cells	29
Discussion.....	38
1. Effects of RA on the differentiation induction of humun neuroblastoma SK-N-SH cells	38
1.1 Effects of RA on the proliferation and cell cycle of human neuroblastoma SK-N-SH cells	38
1.2 Effects of RA on the morphology of neuroblastoma SK-N-SH cells	40
1.3 Effects of RA on the expression of oncogenes and tumor suppressor genes of neuroblastoma SK-N-SH cells	42
1.4 Effects of RA on the expression of neuroal markers of neuroblastoma SK-N-SH cells	44
2. Influence of RA on the proteins expression during SK-N-SH cells differentiation.....	46
3. Effects of the differently expression proteins during SK-N-SH cells differentiation.....	47
4. Differentiation mechanisms of SK-N-SH cells induced by RA	58
Conclusion	62
References.....	63
Plates and illustrations	75
Acknowledgement	86

摘 要

本论文在鉴定维甲酸 (retinoic acid, RA) 诱导人神经母细胞瘤SK-N-SH细胞终末分化基础上, 应用蛋白质组学分析技术, 对SK-N-SH细胞诱导分化过程中细胞蛋白质组变化进行初步研究。分析鉴定与神经母细胞瘤细胞增殖分化相关的特异性蛋白, 并探索它们在神经母细胞瘤细胞诱导分化过程中的调控作用, 以期能够在较为整体水平上进一步认识细胞癌变与逆转机理问题, 从而找出细胞增殖与分化调控研究的新方向。

实验结果显示, 经1 $\mu\text{mol/L}$ RA 处理之后, 人神经母细胞瘤SK-N-SH细胞的增殖受到抑制, 细胞生长抑制率达36.16%; 细胞周期发生了G₀/G₁期阻滞; 光镜与电镜观察结果显示, RA处理后SK-N-SH细胞形态和超微结构发生恢复性变化, 产生了细胞呈极性状、伸出多个轴突树突状突起、细胞逐渐变小变圆并融合在一起形成类似神经节样结构、细胞表面微绒毛减少、核仁变少变小、常染色质增多、细胞器丰富发达等显著变化; 免疫细胞化学检测显示RA处理后SK-N-SH细胞癌基因c-myc、c-fos的表达下调而抑癌基因p53、p27的表达上调, 并进一步促使SK-N-SH细胞NSE、MAP2、Synaptophysin等神经元特异性标志物的表达。双向凝胶电泳分析显示在RA诱导SK-N-SH细胞分化前后存在26个差异表达蛋白点, 质谱分析鉴定了其中16个蛋白, 其中表达上调的蛋白点有: Rab GDP dissociation inhibitor, RABGAP1L protein (RAB GTPase activating protein 1-like), DNMI1 protein, SP110, Myoneurin, DNA topoisomerase II binding protein, Human iroquois-class homeodomain protein IRX-5和Alpha-enolase, 而BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1 (BNIP1)和PHD finger protein 20-like 1为新出现的蛋白点; 表达下调的蛋白为cell division cycle 73, interleukin-8, RAB37, Methyltransferase (DNMT) 和Vav 3 oncogene protein, 而HP protein为诱导处理后消失的蛋白点。获得鉴定的16个蛋白包括基因表达调控因子、肿瘤相关基因表达产物、神经细胞功能性蛋白、DNA损伤修复蛋白等, 其中DNMI1、Myoneurin、IRX-5首次发现与细胞的癌变和分化相关, 而PHD finger、SP110、IRX-5首次发现与神经细胞分化、神经母细胞瘤分化相关。

研究结果表明, 1 $\mu\text{mol/L}$ RA对人神经母细胞瘤SK-N-SH细胞具有显著的诱

导分化作用，通过抑制细胞增殖、阻滞细胞周期、调控癌基因和抑癌基因表达以及促进分化相关标志物表达促进细胞分化。在SK-N-SH细胞分化的同时，细胞蛋白质组成也相应发生明显变化，差异表达蛋白包括基因表达调控因子、肿瘤相关基因表达产物以及神经细胞功能性蛋白等，在神经母细胞瘤分化过程中的有重要作用。

关键词：维甲酸（RA）；人神经母细胞瘤SK-N-SH细胞；诱导分化

ABSTRACT

In this study, after we investigated the differentiation effects of the human neuroblastoma SK-N-SH cells induced by Retinoic Acid (RA), we use proteomics to analyze the differently expressed proteins, in order to know the molecular mechanisms of carcinogenesis and malignant phenotypic reversion in a systematic level, and to find a new way of tumor differentiation research.

The results showed that after treated with 1 μ mol/L RA, the proliferation rate of SK-N-SH cells was inhibited, the inhibition rate amounts to 36.16%, and the cell cycle was arrested at G₀/G₁ phase; the morphology and ultrastructure of SK-N-SH cells changed, cells became multipolar with several neurites, the cell bodies were smaller with long axonal processes between one another to formed ganglion, the microvilli in the cell faces were rare, the nucleolus reduced while the euchromatin increased, and the organelles developed; The immunocytochemistry assay also revealed that the expression level of oncogene including c-myc、c-fos was downregulated, and the expression level of tumor suppressor gene including p53、p27 was upregulated, and at the same time, the expression of the neuronal markers of terminal differentiation, including NSE, MAP2 and Synaptophysin were strongly positive after treatment. Were found 26 proteins differently expressed after treated, and 16 proteins were identified. In these 16 proteins, 10 proteins were upregulated, such as Rab GDP dissociation inhibitor, RABGAP1L protein (RAB GTPase activating protein 1-like), DNM1L protein, SP110, Myoneurin, DNA topoisomerase II binding protein, Human iroquois-class homeodomain protein IRX-5 and Alpha-enolase, BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1 (BNIP1) and PHD finger protein 20-like 1 were new proteins; and 6 proteins were identified lower expression, such as cell division cycle 73, interleukin-8, RAB37, Methyltransferase (DNMT) and Vav 3 oncogene protein, and HP protein was disappeared after treated. And DNM1L, Myoneurin, IRX-5 were first found in tumor differentiation, while PHD finger、SP110、IRX-5 were first found in neuron or neuroblastoma differentiation.

In conclusion, 1 μ mol/L RA can induce SK-N-SH cells into terminal differentiation, via proliferation inhibited, G₀/G₁ phase arrested, downregulated oncogene expression, upregulated suppressor gene expression and induced expression of neuronal markers. At the same time, the proteomics of the SK-N-SH cells were changed after induced, we identified 16 differently expressed proteins during differentiation, including regulators of gene expression, proteins of tumor gene and neuronal proteins, and so on, and it is possible to get a system understanding of the molecular mechanisms of RA induced differentiation.

Key Words: Retinoic Acid (RA); Neuroblastoma SK-N-SH cell ; induced differentiation

前言

1. 肿瘤的危害及抗癌研究现状

以恶性肿瘤为主的慢性疾病对人类的健康及生命构成极大的威胁,它不仅威胁人的生命健康,而且已成为造成人类死亡的一个重要原因。有数据统计表明在过去的几十年间,人类总死亡率在下降,而因恶性肿瘤死亡的人数占总死亡人数的比率逐年提高。世界卫生组织发布的资料显示,全球恶性肿瘤每年发病人数达1000万人以上,死亡人数达620余万,约占世界总死亡人口的10%;并预测到2020年,癌症的发病人数将增加50%,达1500万,而我国卫生部最近的资料显示,恶性肿瘤每年发病180万人以上,每年死亡120余万人,占全国总死亡人口的15%以上,无论是城市还是农村,癌症的发病率已超过了心血管疾病,上升到第一位^[1,2],成为严重威胁人类生命的常见病多发病。目前,治疗肿瘤的传统方法主要有手术、放疗、化疗,此外还有免疫疗法、介入治疗、热疗等,但其疗效都不理想,因为这些方法缺乏对肿瘤细胞的特异性,往往在杀灭或去除恶性肿瘤细胞的同时对患者及其正常细胞造成不同程度的伤害,且存在治疗效果差、容易复发、产生耐药性等问题。由于传统的治疗方法自身的局限性,已成为攻克癌症问题的薄弱环节,因此如何从细胞癌变机制入手,依据现代细胞癌变机理,找寻肿瘤治疗新方法,已被人们所重视,成为现代肿瘤治疗的新方向。

现代细胞生物学与分子生物学研究成果已经充分证明:细胞癌变是一种与基因表达紊乱、细胞分化异常密切相关联的疾病^[3,4,5]。肿瘤发生是多基因、多阶段、多步骤的过程,涉及到多种癌基因的激活和抑癌基因的失活^[6],癌基因的激活使其产物过量表达导致细胞增殖信号过强,抑癌基因的失活使其产物表达过少而使分化信号受到阻抑,从而产生细胞增殖分化两者之间的平衡调节失控,引起细胞增殖异常、细胞分化紊乱。肿瘤细胞最显著的生物学特性是无限增殖和分化异常,因此从发育生物学的角度,癌症可看作是一类细胞增殖失控和分化异常的疾病。肿瘤细胞起源于一些未分化或微分化的干细胞,本身具有分化潜能又具有分化异常的特性,为肿瘤治疗提供了新的思路和方法。针对肿瘤细胞增殖分化异常,利用外源性的诱导分化物干预和调节肿瘤细胞相关基因的表达,使肿瘤细胞恶性表型逆转,促使其朝正常细胞方向分化,这就是诱导分化治疗模式的基本思想。

随着越来越多细胞分化诱导物的发现和细胞癌变分子机理的逐步阐明,肿瘤细胞分化诱导研究已成为肿瘤生物学和肿瘤生物治疗的主要研究领域。肿瘤细胞诱导分化不仅是肿瘤细胞分子生物学的核心问题之一,也是当代生命科学研究中的重要研究领域,进行肿瘤细胞诱导分化研究不仅能够揭示细胞增殖与分化间的平衡关系,探讨细胞增殖分化调控原理、细胞基因表达调控原理及细胞的信号转导机制,同时还能阐明细胞癌变机理及肿瘤细胞分化逆转机制,因此在细胞生物学和肿瘤细胞生物学研究中具有十分重要的意义。

2. 肿瘤细胞诱导分化研究的理论和实践意义及发展方向

2.1 肿瘤细胞诱导分化的概念及其理论实践意义

肿瘤细胞诱导分化(induction of differentiation)是指恶性肿瘤细胞在体内外分化诱导物作用下,向正常或接近正常细胞方向分化逆转的现象。诱导分化作为恶性肿瘤的一种新型治疗方法,基本特点在于不杀伤肿瘤细胞,而是诱导肿瘤细胞分化为正常或接近正常细胞^[7]。

肿瘤是一种细胞分化紊乱疾病,涉及了多种基因的异常表达或失活,但肿瘤细胞具有与正常细胞相同的完整基因组,因此通过一定刺激诱导癌细胞重新分化发育,就有可能使之成为结构和功能上的正常细胞,这是诱导分化治疗模式的基本思想。科学家们也通过大量的体外癌细胞株诱导分化实验证实了肿瘤细胞诱导分化这一思想的正确性:1960年Pierce等最早发现小鼠睾丸畸胎瘤细胞可自发地分化成良性或正常细胞;20世纪70年代后期,Sachs^[8]发现在某些能够抑制增殖和诱导分化的物质作用下,小鼠白血病细胞系的分化受阻有时是可逆的,因此他最早提出了诱导分化治疗(differentiation therapy)的概念;同时,Breitman等^[9]发现维甲酸能够诱导HL-60和其他一些人体白血病细胞分化。近年来癌细胞的诱导分化的研究非常活跃,越来越多的体外实验表明,在某种诱导分化物作用下,肿瘤细胞可被诱导分化,出现类似正常细胞的表型或恢复正常细胞的某些功能。

肿瘤细胞的诱导分化着眼于肿瘤细胞增殖分化过程的基因表达调控和信号转导途径,针对肿瘤细胞增殖失控、分化程度低的特点,应用分化诱导物调节细胞分裂周期,干预肿瘤相关基因的表达,抑制其恶性增殖,诱导肿瘤细胞向成熟

阶段分化,并通过改变肿瘤细胞蛋白表达谱系,使肿瘤细胞的恶性表型和功能特征向正常或接近正常细胞的方向逆转,进而走向终末分化^[10]。近年来,肿瘤细胞的诱导分化机理研究及对新的诱导分化物的探索有了进一步的发展,为临床肿瘤治疗开辟了一条新的途径。

肿瘤细胞诱导分化治疗作为肿瘤治疗的新型方法,与传统的肿瘤治疗方式相比,具有用药剂量小、毒副作用少、不易复发等优势^[11],它的出现,对于癌症的治疗提供了一种全新的治疗理论与方法,能克服目前肿瘤治疗中的困难和不足,是解决肿瘤临床治疗的根本途径。因此,以肿瘤细胞为模型的体外诱导分化研究不仅可以加深对癌变机理的研究,而且诱导分化研究中发现的与细胞癌变和表型逆转相关的基因表达产物还可以作为肿瘤诊断的标志物或抗癌药物研究治疗的靶标,此外,诱导分化研究在抗肿瘤诱导分化药物的筛选、以及探索和开辟肿瘤生物治疗的新途径等方面具有十分重要的实践意义。

细胞增殖和分化是细胞生命活动的重要特征之一,而细胞癌变则是增殖分化研究领域的一个特殊问题,对细胞增殖分化的基本规律及调控机理的研究不仅是认识生物生长和发育的基础,而且是研究癌变发生及其逆转的重要途径。肿瘤细胞诱导分化研究主要通过干预和调控癌基因表达促进癌细胞走向分化从而逆转其恶性表型,这个过程涉及细胞增殖分化、细胞周期调节、基因表达调控以及信号转导等各个方面,是一系列基因的表达与各种调控因子协同作用的复杂过程,对这一过程的研究不仅有助于进一步了解细胞增殖分化过程中的癌基因与抑癌基因表达调控机制和细胞信号转导途径,揭示细胞增殖和分化的关系,认识细胞增殖分化的调控机制,同时还可阐明肿瘤发生发展以及恶性表型逆转的机理,从而对揭示细胞生物学和肿瘤生物学研究领域的核心问题即细胞增殖与分化调控机理具有十分重要的理论意义。

2.2 肿瘤细胞诱导分化研究的现状及发展方向

肿瘤细胞诱导分化的研究开始于上世纪七十年代,目前,肿瘤细胞诱导分化研究主要集中于两方面,一方面是寻找有效的分化诱导物与分化疗法,另一方面是进行诱导分化机理的研究。

肿瘤细胞诱导分化物的寻找是肿瘤诱导分化研究的重要方面。目前,已发现

了多种诱导分化物具有诱导肿瘤分化的作用,这些常用的诱导分化物按其来源主要分为两类:一类是外源性分化诱导物,即肿瘤或宿主细胞不能产生而必须依赖外界补给的诱导分化物,如维甲类化合物及维生素D3,苯乙酸盐及其类似物苯丁酸盐,简单有机化合物如正丁酸盐,佛波酯类化合物,环六亚甲基二乙酰胺(HMBA),抗癌抗生素类如丝裂霉素、放线菌素D等;另一类是内源性分化诱导物,即肿瘤或宿主细胞所产生的具有诱导分化作用的化学物质,如嘌呤与嘧啶同系物双丁腺环化腺苷酸8-cl-cAMP,集落刺激因子,糖皮质激素,前列腺素,干扰素及细胞因子类^[12~16],它们多是一些细胞自身产生的细胞信号调节中作为信使的细胞因子。诱导分化物在体外实验中大多可诱导多种肿瘤细胞分化,苯乙酸(PA)、本丁酸(PB)可诱导人黑色素瘤细胞分化等^[17],而维甲酸诱导人早幼粒白血病细胞分化已成为诱导分化治疗的经典范例^[18]。此外,许多中草药及其有效成分被证明具有肿瘤诱导分化的作用,如人参皂甙、苦参碱、丹参酮等。目前,从天然产物及合成化合物中寻找新的分化诱导物的工作正在广泛进行,这不仅为理论研究者所重视,也是抗癌药物研究的重点。不同的分化诱导物对不同肿瘤的作用效果存在较大差异,因而研究肿瘤发病机制与不同诱导物作用下的分化机制对于合适的药物选择具有重要意义。随着越来越多的新的分化诱导物的发现,肿瘤细胞诱导分化研究逐渐成为细胞生物学、肿瘤生物学和肿瘤治疗与抗癌药物研究所共同关注的重要领域。

肿瘤细胞诱导分化的机理研究历来受到国内外学者的重视,目前已发展到细胞、亚细胞和分子水平。目前认为肿瘤细胞诱导分化并非是肿瘤细胞恶性转化的一个完全相反过程,它与细胞外环境、细胞内信号传递系统、癌基因、抑癌基因等多方面因素密切相关,涉及增殖分化调节的复杂网络系统,是一个涉及多环节、多步骤、多靶点的复杂过程,不同类型的诱导分化物对同一种肿瘤细胞以及同一种诱导分化物对不同肿瘤细胞的诱导分化机制也有所不同,其确切的作用机理尚待深入探索。从分子生物学的角度出发,目前国际上主要的诱导分化物作用机制可以归纳为以下几个方面:(1)诱导分化物通过干预调节肿瘤细胞相关基因的表达,重新启动细胞抑癌基因(如p53、p27、Rb等),同时抑制恶性增殖基因(如bcl-2、c-myc、c-fos等),调节细胞的增殖和周期进程,抑制细胞生长,并且阻止细胞通过G₁/S检控点,阻滞细胞周期于G₀/G₁期。(2)外源诱导物通过调

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库